

Невзорова Татьяна Александровна

**ДНК-ГИДРОЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ К ДНК
ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2005

Работа выполнена на кафедре биохимии
Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Винтер Виктор Георгиевич

Официальные оппоненты: Академик АН РТ,
доктор медицинских наук, профессор
Зубаиров Дилявер Мирзаабдуллович

доктор биологических наук,
Чернова Ольга Александровна

Ведущая организация: Казанский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии

Защита состоится «_24_» __марта__ 2005 года в _13⁰⁰_ часов на заседании дис-
сертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете
(420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 209)

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени
Н.И.Лобачевского при КГУ

Автореферат разослан «_22_» __февраля__ 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Аскарова А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В исследованиях последнего двадцатилетия открыта новая функция антител (АТ) – способность катализировать различные биохимические реакции, то есть выступать в роли биологических катализаторов (Tramontano et al., 1986; Pollack et al., 1986; Paul et al., 1989). По аналогии с ферментами такие АТ были названы абзимы (от англ. **antibody enzyme**) или каталитические АТ. Согласно сложившимся представлениям, наличие в крови абзимов является чётким признаком протекания в организме аутоиммунных процессов.

Системная красная волчанка (СКВ) – одно из наиболее тяжёлых аутоиммунных воспалительных заболеваний соединительной ткани неясной этиологии. Заболеваемость СКВ по различным данным варьирует от 1:10000 до 1:1000 населения (Bongu et al., 2002; Gill et al., 2003). Ежегодно регистрируют до 7 новых случаев СКВ на 100000 населения. В ряде исследований получены данные о существенном повышении уровня распространённости СКВ (более чем в 3 раза) за последние четыре десятилетия: заболеваемость СКВ в 1950-1979 гг. составляла 1.51 случая на 100000 населения, а в 1980-1992 гг. – 5.56 случая на 100000 населения (Scolding and Joseph, 2002).

В патогенезе СКВ важное место отводится иммунным механизмам, многие аспекты которых, несмотря на интенсивное изучение, остаются невыясненными и ряд вопросов, касающихся этиологии, патогенеза и лечения СКВ требуют изучения. Поэтому СКВ к настоящему времени уже является не только медицинской, но биологической и социальной проблемой.

Характерным признаком СКВ является высокий уровень содержания в сыворотках крови больных по сравнению с нормой АТ к нативной ДНК (нДНК) класса IgG, и определение титра которых имеет важное прогностическое и диагностическое значение. Среди этих АТ к нДНК были обнаружены АТ, которые обладают ДНК-гидролизующей активностью (Shuster et al., 1992).

Изучению как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих АТ посвящено большое количество работ. Многими исследователями признаётся тот факт, что именно IgG-АТ к нДНК ответственны за развитие заболевания, тогда как относительно роли ДНК-гидролизующих АТ к ДНК однозначного ответа нет. Механизмы реализации патологических свойств ДНК-абзимов и их клиническое значение пока остаются невыясненными. До сих пор среди исследователей нет единого мнения о происхождении, свойствах, структуре, механизмах действия, биологической роли АТ к нДНК при СКВ, в том числе обладающих нуклеазной активностью. Все полученные данные (иммунохимические, ферментативные свойства АТ) говорят в пользу того, что популяция IgG-АТ к нДНК гетерогенна, однако о составе этих фракций среди авторов также нет общего мнения.

Одним из основных препятствий на пути к выяснению проблемы взаимосвязи каталитической активности АТ к нДНК с патогенезом и клиническими проявлениями заболевания является отсутствие единого методического подхода к выделению и характеристике разных субпопуляций АТ к ДНК из сыворотки крови больных.

Кроме того, используемые в настоящее время методы изучения нуклеазной активности АТ только косвенно указывают на возможные механизмы реализации их ферментативной активности и не позволяют наглядно обосновать полученные данные. Для изучения механизма действия ДНК-гидролизующих АТ используются различные методы (электрофорез ДНК в агарозном геле, метод линейного дихроизма,

электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем ДНК-субстрат), однако они позволяют определять только конечные продукты реакции гидролиза ДНК абзимами, но не промежуточные. Изобретение в 1986 г. атомно-силового микроскопа (АСМ) (Binnig et al., 1986) позволило биологам не только визуализировать отдельные макромолекулы, но и получить информацию о кинетике взаимодействия нескольких макромолекул, что, как правило, недоступно при других методах исследования.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение ДНК-гидролизующей активности антител к нативной ДНК при системной красной волчанке.

Были поставлены следующие задачи:

- выделить из сыворотки крови больных системной красной волчанкой субфракции антител к нативной ДНК класса IgG;
- изучить физико-химические свойства и ДНКазную активность полученных препаратов субфракций антител к нативной ДНК;
- изучить взаимодействие ДНК-гидролизующих антител к нативной ДНК с ДНК методом атомно-силовой микроскопии.

Научная новизна. Установлено, что популяция антител к ДНК у больных с дебютом СКВ гетерогенна и состоит из четырёх субфракций IgG-антител к нативной ДНК, различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе и проявляющих различное сродство к аффинному сорбенту нДНК-целлюлозе. Показано, что ДНК-гидролизующие антитела к нативной ДНК являются металлозависимыми эндонуклеазами, вносят в ДНК преимущественно одноцепочечные разрывы и проявляют активность в широком диапазоне значений pH.

Установлено, что активные формы кислорода при СКВ активируют термолабильную ДНКазную активность сывороточных нуклеаз в отличие от термостабильной ДНК-гидролизующей активности антител к нативной ДНК, которая не изменяется или ингибируется под действием активных форм кислорода.

Методом атомно-силовой микроскопии получены трёхмерные изображения комплексов ДНК–ДНК-гидролизующее антитело к нативной ДНК с нанометровым разрешением и продемонстрировано, что для ДНКазной активности антител характерен непроточный механизм действия.

Установлено, что в активном антигенсвязывающем центре абзимы имеют два участка: первый – «якорная площадка», которая обуславливает специфичность взаимодействия антител с молекулой ДНК, и второй – активный центр, ответственный за проявление энзиматической активности.

Практическая значимость. Разработана методика фракционирования антител к нативной ДНК класса IgG из сыворотки крови больных СКВ, которая позволяет получать четыре субфракции антител к нативной ДНК, различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе, сродству к аффинному сорбенту нДНК-целлюлозе, и содержащих ДНК-гидролизующие антитела. Оптимизирован метод изучения ДНК-гидролизующей активности антител к нДНК на атомно-силовом микроскопе Solver P47H со сканирующей измерительной головкой типа «Смена-Б» («НТ-МТД», Россия). Полученные результаты могут служить теоретической и методической основой для исследований проблем ферментативной активности антител при аутоиммунных заболеваниях человека.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались на IX

международной конференции молодых учёных «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Казань, 1998); V Международной конференции «Biochemistry of Health and Diseases» (Israel, 1998); Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 1998); Всероссийской научной конференции III Вавиловские чтения «Социум в преддверии XXI века: итоги пройденного пути, проблемы настоящего и контуры будущего» (Йошкар-Ола, 1999); XIII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 1999); XII юбилейной всероссийской конференции «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 2001); II Российской конференции молодых учёных России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2001); III съезда биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002); Международной научной конференции «Новая геометрия природы» (Казань, 2003); VII Всероссийской молодёжной научной школы «Когерентная оптика и спектроскопия» (Казань, 2003); XXI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2004); VIII Международной молодёжной научной школы «Когерентная оптика и спектроскопия» (Казань, 2004), а также на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета в 1997-2005 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов работы, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 35 рисунков. Список использованной литературы включает 259 наименований, из них 57 отечественных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились АТ к нДНК, выделенные из крови 7 первично выявленных больных СКВ, находящихся в острой фазе с различной степенью тяжести заболевания и на момент забора крови не получавших лечения преднизолоном (5 женщин в возрасте от 17 до 52 лет и 2 мужчин – 48 и 62 года). В качестве контроля использовали сыворотки крови клинически здоровых доноров.

Выделение из сыворотки крови субфракций АТ к нДНК включало в себя высаживание IgG сульфатом аммония, гель-фильтрацию на акрилексе Р-6, фракционирование АТ методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и аффинную хроматографию на нДНК-целлюлозе микрокристаллической – аффинном сорбенте, который подбирали экспериментально и готовили по методу Litman (1968) с некоторыми модификациями. Все стадии очистки АТ проводили при +4°C в холодильной камере MiniColdLab (LKB, Sweden) с использованием стерильных буферных растворов.

На колонку с нДНК-целлюлозой, промытой от несвязавшейся нДНК и уравновешенной 10-кратным объемом буфера Б (0.02 М трис-HCl, pH 7.5, 0.05 М NaCl, 0.002 М ЭДТА), наносили по отдельности фракции IgG-АТ: несвязавшуюся с ДЭАЭ-целлюлозой (фракция I) и фракцию IgG, связавшуюся с сорбентом (фракция II). Белки, не взаимодействующие при посадке с сорбентом, отмывали буфером Б до полного исчезновения оптического поглощения при 280 и 260 нм. АТ, связавшиеся с нДНК-целлюлозой, элюировали 1 М NaCl в буфере Б (субфракции Ia и IIa), Gly-HCl (0.1 М глицин-HCl, pH 2.3) (субфракции Ib и IIб) и посадочным буфером Б. Полу-

ченные Gly-HCl субфракции АТ сразу же нейтрализовали 1 М трис-HCl, pH 8.0.

Все собранные субфракции АТ концентрировали струёй воздуха, диализовали против 10 mM трис-HCl-буфера, pH 7.5 в течение 48 ч при +4°C с периодической сменой буфера и спектрофотометрически рассчитывали концентрацию белка.

Гомогенность препаратов IgG на каждой стадии их очистки исследовали **Ds-Na-ПААГ-электрофорезом** с последующим окрашиванием белков AgNO₃ (Laemmli, 1970; Остерман, 1981). Значения pI препаратов IgG определяли **изоэлектрофокусированием** на приборе Multiphor (Остерман, 1983; Ригетти, 1986). Оценку уровня содержания и взаимодействия АТ с нДНК изучали методом **иммуноферментного анализа** (ИФА) в модификации, предложенной Саттаровой и др. (1994).

Выделение и очистку плазмидной ДНК pBR-322 из клеток *E. coli* HB-101 после амплификации осуществляли методом щелочной экстракции без ультрацентрифугирования. Плазмидную ДНК очищали от белков и РНК методом гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-4B (Маниатис и др., 1984; Кузнецова и Винтер, 1997).

ДНК-гидролизующую активность АТ к ДНК оценивали по превращению суперскрученной ДНК плазмиды pBR-322 в кольцевую и линейную формы.

Зависимость ДНК-гидролизующей активности АТ от состава инкубационной среды изучали, варьируя pH реакционной смеси (от 5.0 до 9.8) и концентрации различных ионов двухвалентных металлов.

Гидролиз плазмидной ДНК pBR-322 и ДНК эритроцитов цыплёнка антителами к ДНК сывороток крови здоровых и больных СКВ людей, после обессоливания, ионообменной и аффинных хроматографий осуществляли в реакционной смеси, содержащей 25 mM трис-HCl-буфер, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, (или 25 mM трис-HCl-буфер, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM ЭДТА) 20-75 мкг/мл плазмидной ДНК pBR-322 (содержащей 60-80% суперскрученной формы ДНК) или 20 мкг/мл ДНК эритроцитов цыплёнка. Реакцию начинали добавлением АТ (в различных вариантах): а) до конечной концентрации белка 0.01-0.5 мг/мл, прогретого при +57°C в течение 45 минут или не подвергавшегося такому воздействию; б) 0.04-0.1 мг/мл АТ к нДНК; в) двухэтапным внесением АТ к нДНК через определённые временные интервалы, и г) одновременным внесением IgG-АТ к нДНК с конечными концентрациями в смеси 0.08-0.15 мг/мл.

Во время инкубации при +37°C из реакционных смесей отбирали аликвоты по 10 мкл через фиксированные временные интервалы в течение 1-24 часов, которые моментально замораживали для предотвращения дальнейшего гидролиза.

Значения величин кинетических параметров реакции гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 антителами к ДНК (V_{\max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) определяли графическими методами (Варфоломеев и Гуревич, 1999; Келети, 1990) с использованием программы Prism 4. Начальные скорости гидролиза ДНК определяли методом электрофореза в агарозном геле. Для оценки приблизительной максимальной концентрации ДНК-абзимов в общем пуле препаратов субфракций АТ к нДНК использовали кинетические методы, предложенные Brocklehurst и др. (2001; Topham et al., 2000).

Оценку влияния активных форм кислорода (АФК) на ДНК-гидролизующую активность АТ к ДНК проводили в реакционной смеси, содержащей: 25 mM трис-HCl-буфер, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 20 мкг/мл плазмидной ДНК pBR-322. Реакцию начинали добавлением АФК (7.0 мкМ H₂O₂, 0.4 мкМ аскорбата, 1.25 мкМ Fe(II), 2.5 мкМ ЭДТА – концентрации, подобранные экспериментально), 0.1 мг/мл препаратов АТ к нДНК.

Во время инкубации при $+37^{\circ}\text{C}$ из реакционных смесей отбирали аликвоты по 10 мкл в определённые временные интервалы в течение 1-20 ч и добавляли перехватчик электронов - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ до концентрации 0.5 мМ. Влияние АФК на взаимодействие АТ с ДНК исследовали методом ИФА, где в качестве антигенов использовали: нДНК из эритроцитов цыплят, дДНК, полученную методом тепловой денатурации, и нДНК, модифицированную АФК (АФК-ДНК) (Cooke et al., 1997; Ashok and Ali, 1998). Препараты АТ вносили в лунки планшета с адсорбированными ДНК и в одном из вариантов к нДНК одновременно с АТ вносили АФК. Планшет интенсивно встряхивали на качалке в течение 1-2 мин и далее реакцию ИФА проводили по схеме.

Оценку результатов гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 осуществляли методами: **электрофореза** в 0.7% агарозном геле с окрашиванием ДНК этидий бромидом и получением денситограмм, используя программу Scion Image 4.0.2 (beta), **флуоресцентной спектроскопией** на спектрофотометре MPF-4 «Hitachi» и атомно-силовой микроскопией (АСМ). Гидролиз ДНК эритроцитов цыплёнка оценивали АСМ.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). После подбора и оптимизации методики приготовления образцов ДНК для АСМ процедуру приготовления исследуемых образцов проводили по следующей схеме. Перед сканированием на АСМ исследуемые пробы разводили 25 мМ трис-НСI-буфером, рН 7.5, 5 мМ MgCl_2 до концентрации 0.125-1.0 мкг/мл ДНК эритроцитов цыплёнка, 2.5-5.0 мкг/мл плазмидной ДНК или 25 мкг/мл АТ. 2 Мкл исследуемого образца наносили на свежесколотую пластинку слюды (1×1 см), инкубировали 3-5 мин при комнатной температуре, промывали 1 мл бидистиллированной деионизованной стерильной воды и высушивали на воздухе, а далее над силикагелем.

Визуализацию ДНК и АТ проводили в полуконтактном режиме на воздухе при комнатной температуре на АСМ Solver P47H со сканирующей измерительной головкой «Смена-Б» и использовали кремниевые кантилеверы NSG11 длиной 100 мкм, радиусом иглы около 10 нм, коэффициентом упругости 11.5 Н/м, резонансной частотой 190 и 255 kHz («НТ-МТД», Россия). Параллельно с измерением топографии поверхности (высоты) фиксировали изменения амплитуды колебаний кантилевера. Сканирование проводили с разрешением 512×512 точек и рабочей амплитудой колебаний кантилевера 9-23 нм, подобранной экспериментально.

Обработку АСМ-изображений и определение размеров сканированных объектов проводили с помощью программного обеспечения Nova RC 1.0.26.578 для зондовых микроскопов компании «НТ-МТД», Россия. Для подсчёта длины (нм) молекул ДНК использовали программу DNA Processing Application 2.6. Характер распределения данных в полученных выборках индивидуальных значений длины молекул ДНК анализировали с применением структурного среднего – медианы. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрических ранговых критериев: Краскелла-Уоллиса, Т-критерий Манна-Уитни и Дана (Лакин, 1990; Акберова, 2004а; Акберова, 2004б).

Объём каждой выборки (численность группы) более 100 молекул ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и характеристика субфракций антител к нативной ДНК, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, из сывороток крови больных СКВ

Так как АТ к нДНК являются одной из фракций IgG, то для получения образцов АТ к нДНК на первых этапах уделяли основное внимание обнаружению и выделению

IgG, содержащих АТ к нДНК с ДНК-гидролизующей активностью, из сывороток крови больных СКВ. Выделение и очистку IgG-АТ к нДНК из сывороток крови проводили согласно схеме, представленной на рис. 1.

Как было установлено, при хроматографическом разделении белков сыворотки крови на ДЭАЭ-целлюлозе, 50-60% нанесённого белка не сорбируется, 30-50% фиксируется на колонке. Фракция белка, несорбируемая на ионообменнике, выходящая одним пиком, обозначена как **фракция I**. Применение градиента концентраций NaCl позволило разделить белки, связавшиеся с анионообменником, на четыре пика. Белки, связавшиеся с анионообменником, были названы **фракцией II**.



Рис. 1. Схема выделения АТ к нДНК из сыворотки крови больных СКВ

Для анализа состава отдельных пиков обеих фракций с целью определения содержания в них максимального количества IgG-АТ к нДНК с ДНК-гидролизующей активностью использовали препараты белков, соответствующие максимальному значению оптической плотности при длине волны 280 нм каждого пика.

Согласно данным электрофоретического анализа в ПААГе, обе фракции после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе содержат IgG с молекулярной массой ~ 150 кДа. Пик фракции I – только IgG и не содержит примесей других сывороточных белков. Электрофоретическое разделение белков пиков фракции II приводит к окраске серебром нескольких белков, в том числе и IgG, концентрация которого по мере увеличения градиента NaCl в элюирующем буфере уменьшается. Три первых пика фракции II содержат максимальное количество IgG.

Методом ИФА нДНК-связывающие IgG-АТ были обнаружены в обеих фракциях АТ, но уровень содержания АТ к нДНК во фракции I выше, чем в пиках фракции II.

Для выяснения, обладают ли обнаруженные и полученные фракции АТ к нДНК ДНК-гидролизующей активностью, провели оценку способности IgG-АТ пиков гидролизовать суперскрученную плазмидную ДНК pBR-322.

Известно, что в сыворотке крови человека содержатся собственные ДНКазы. Мы провели сравнительные исследования термостабильности ДНКаз сыворотки крови и нуклеазной активности антител. Прогревание сыворотки крови здоровых доноров при +57°C в течение 45 мин ведёт к полной инактивации сывороточных нуклеаз. ДНК-гидролизующая активность АТ к нДНК в сыворотке крови больных СКВ сохранялась высокой после предварительной температурной обработки сыворотки при +57°C в течение 45 мин.

На основании полученных данных при дальнейших исследованиях ДНКазной активности АТ к нДНК все препараты АТ, полученные на различных этапах выделения и фракционирования, предварительно прогревали 45 мин при +57°C.

Было обнаружено, что обе фракции после ионообменной хроматографии содержат ДНК-гидролизующие АТ, что сопровождается переходом суперскрученной ДНК pBR-322 в открытую кольцевую форму. Однако пики АТ фракции II имели более выраженную ДНКазную активность, чем пик фракции I.

Для дальнейшего выделения из обеих фракций IgG антител к нДНК пик фракции I объединяли в один первый препарат, а первые три пика фракции II, которые характеризуются максимальным содержанием IgG с ДНК-связывающей и ДНК-гидролизующей активностями, объединяли в суммарный второй препарат. Полученные препараты в дальнейшем названы как фракция I и фракция II соответственно.

По данным изоэлектрофокусирования IgG фракции I имеют pI 7.16–8.3, то есть обладают основными свойствами. Белки суммарной фракции II, которая обогащена IgG-АТ к нДНК с ДНКазной активностью, фокусируются в областях до pI 7.0. Следовательно, объединённая фракция II содержит белки, проявляющие кислые свойства.

Таким образом, в результате фракционирования СКВ-АТ сывороток крови на ДЭАЭ-целлюлозе было получено две фракции IgG, содержащих ДНК-связывающие и термостабильные ДНК-гидролизующие АТ, отличающиеся по сорбции на анионообменнике и являющиеся основными (фракция I) и кислыми (фракция II) белками.

Заключительным этапом выделения и фракционирования АТ к нДНК по степени сродства к нативной ДНК является аффинная хроматография на нДНК-сорбенте. Перед нами стояла проблема выбора надёжного аффинного ДНК-сорбента, который позволил бы эффективно отделить IgG-АТ, взаимодействующие с нДНК, от других АТ. Были опробованы методы ковалентной посадки нДНК на разные эпоксиактивированные матрицы: сефарозу и целлюлозу, и нековалентной посадки нДНК на целлюлозные матрицы (волоконистую и микрокристаллическую) по методу Литман с некоторыми модификациями. Полученные результаты показали, что нековалентный способ закрепления нДНК на матрице является наиболее эффективным, поскольку при этом методе посадки с носителем связывается большее количество ДНК (до 90%), чем при ковалентном связывании. В результате предварительных аффинных хроматографий АТ на приготовленных нековалентным способом закрепления ДНК на разных целлюлозных матрицах было установлено, что на нДНК–целлюлозе волокнистой

происходит сильное расширение хроматографических зон. Таким образом, был выбран аффинный сорбент нДНК-целлюлоза микрокристаллическая и в дальнейшем для окончательной очистки АТ к нДНК из обеих фракций IgG проводили аффинную хроматографию на нДНК-целлюлозе микрокристаллической.

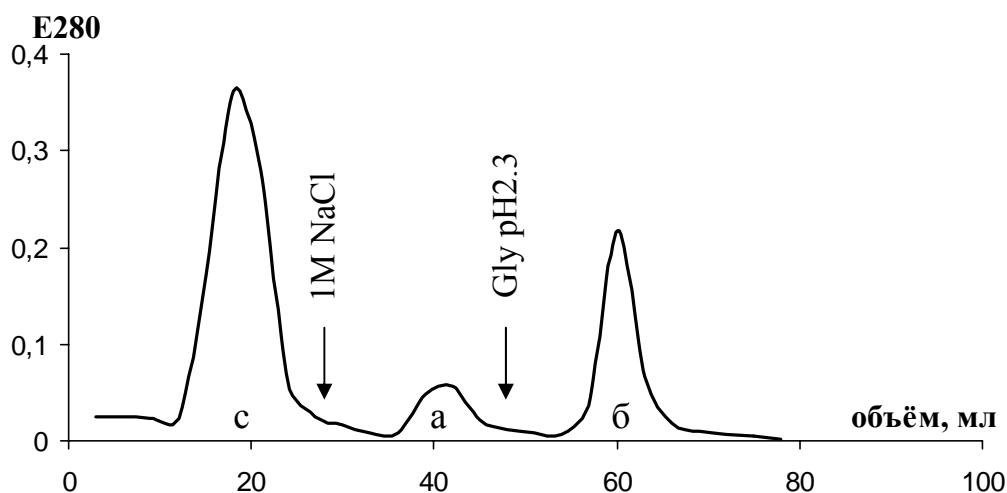


Рис. 2. Профиль аффинной хроматографии АТ на нДНК-целлюлозе, уравновешенной буфером с pH 7.5

а – АТ к нДНК, элюированные с сорбента буфером, содержащим 1М NaCl, *б* – АТ к нДНК, элюированные с сорбента глицин-HCl-буфером, pH 2.3, *с* – белки, несвязавшиеся с нДНК-сорбентом

На рис. 2 приведён типичный профиль фракционирования IgG-АТ на нДНК-целлюлозе. Из таблицы 1 видно, что из фракции I с нДНК-целлюлозой связывается большее количество АТ, чем из фракции II, что может быть объяснено тем, что во фракции II кроме IgG содержатся и другие белки. Установлено, что количество субфракции АТ к нДНК, элюируемой 1М NaCl, составляет наибольшую часть АТ во фракции I, тогда как во фракции II незначительно преобладает субфракция АТ, элюируемых буфером с pH 2.3.

Таблица 1. Количественное соотношение субфракций АТ (в %), полученных аффинной хроматографией фракций I и II сывороток крови больных СКВ на нДНК-целлюлозе

фракция, использованная для выделения АТ	условия элюции АТ с нДНК-целлюлозы		
	посадка препарата	буфер с 1М NaCl	gly-HCl, pH 2.3
фракция I	57.0-74.0	7.5-21.0	3.0-12.0
фракция II	52.5-86.0	2.5-4.5	3.4-7.4

Электрофорез в ПААГе показал, что все полученные субфракции АТ к нДНК из фракции I – IgG с молекулярной массой 150 кДа. АТ к ДНК из фракции II, элюированные буфером с 1М NaCl, содержат кроме IgG другие белки. Субфракция АТ к нДНК из фракции II, элюированных глицин-HCl-буфером, pH 2.3 – только IgG.

Наиболее активно с нДНК в реакции ИФА взаимодействовали субфракции аффинных АТ, элюированные буфером с 1М NaCl. Активность реакции ИФА субфракций АТ к нДНК, элюированных глицин-HCl-буфером с рН 2.3, невысока, что, возможно, объясняется частичной потерей активности в данных условиях элюции. Аналогичная закономерность была отмечена и в работе Леках И.В. и др. (1991; Леках и Поверенный, 1996). ДНК-связывающая активность образцов субпопуляций АТ к нДНК, полученных из фракции I была выше, по сравнению с аналогичными образцами АТ к нДНК, полученных из фракции II.

Все полученные препараты субфракций АТ к нДНК обладали термостабильной ДНК-гидролизующей активностью. Полученные данные согласуются с литературными об элюции ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих АТ из сывороток больных аутоиммунными заболеваниями с нДНК-носителей буфером с высокой ионной силой (Леках и др., 1991; Гололобов и др., 1993; Gololobov et al., 1995). Согласно литературным данным, при использовании буфера с сильно пониженным значением рН 2.0-2.5 с аффинных сорбентов полностью элюируется основной пул ДНК-гидролизующих АТ (Власов и др., 1998; Козырь, 1996).

Препараты АТ, полученные при посадке на нДНК-целлюлозу и не связавшиеся с нДНК-сорбентом из обеих фракций IgG, обладали только ДНК-связывающей активностью. Эти АТ характеризуются низкой аффинностью к нДНК, поэтому при проведении хроматографии не связываются с аффинным сорбентом.

Таким образом, оптимизированный нами метод выделения IgG-АТ к нДНК из сыворотки крови больных с дебютом СКВ, позволил получить препараты четырёх субфракций IgG-АТ к нДНК, проявляющих сродство к аффинному сорбенту нДНК-целлюлозе, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, гетерогенных по заряду и различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе.

Несмотря на достаточно жёсткие условия выделения АТ к нДНК, мы учитывали потенциальную возможность совыделения незначительных количеств ферментов с исследуемыми АТ, поэтому все последующие исследования проводили после преинкубации АТ при +57°C в течение 45 минут. Наше внимание привлёк тот факт, что некоторыми авторами обнаружено снижение активности ДНКазы I в сыворотке крови больных СКВ (Napirei et al., 2000; Tsukumo and Yasutomo, 2004). С другой стороны ДНКазная активность полученных препаратов IgG-АТ к нДНК сохранялась после всех стадий очистки. Если принять во внимание эти факты, то можно предположить, что полученные препараты АТ к нДНК свободны от сывороточных нуклеаз и ДНКазная активность АТ полностью определяется их собственной гидролитической функцией.

Исследование ДНК-гидролизующей активности антител к ДНК

При изучении ДНКазной активности полученных субфракций IgG-АТ к нДНК (влияние состава реакционной среды и условий инкубации) были выявлены некоторые отличия между АТ и от свойств сывороточных ДНКаз, описанных в литературе. Известно, что ДНКазы проявляют активность при рН 7.3-7.6 для ДНКазы I, а ДНКазы крови II – 5.2 (Шапот, 1968); ионы металлов по активирующему влиянию на активность ДНКазы I можно расположить в следующий ряд: $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$ (ed. Burrell, 1993; Барановский и др., 2004).

АТ к нДНК полученных субфракций проявляли активность в широком диапазоне значений рН, то есть ДНК-гидролизующая активность АТ не зависит от рН инку-

бационной среды. Тем не менее, для АТ к нДНК субфракции Ib можно отметить увеличение ДНКазной активности при pH около 6.6 и 7.4, а АТ из фракции II при pH около 7.4 с незначительными максимумами активности в низкой и высокой области спектра pH. Полученные данные могут указывать на то, что субфракции АТ к нДНК, в свою очередь, гетерогенны и отличия могут быть связаны со строением антиген-связывающего центра АТ, а также ДНК-гидролизующие АТ к нДНК не только термостабильны, но и устойчивы к неспецифической денатурации при воздействии pH.

Все исследованные ионы металлов ускоряли АТ-зависимое расщепление ДНК, но в разной степени. Установлено, что ионы Mg^{2+} (и меньше Mn^{2+}) активируют гидролиз плазмидной ДНК pBR-322 антителами, полученными из фракций I и II в концентрации 5 и 10 мМ соответственно. Однако увеличение концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} до 10 мМ ингибирует активность АТ субфракции Ib. Ионы Zn^{2+} и Ca^{2+} слабо активируют гидролиз ДНК антителами. Увеличение концентрации Ca^{2+} приводит к ингибированию реакции, катализируемой антителами из фракции I, однако ускоряют гидролиз ДНК антителами подфракции Ia аналогично ионам Mn^{2+} . Возможно, что в ДНКазной активности IgG-АТ имеет место нуклеофильная атака гидроксил-ионом, активируемым ионами Mg^{2+} . Однако максимальную активность в реакции гидролиза суперскрученной ДНК проявляли АТ к нДНК всех субфракций в присутствии ионов Co^{2+} . Аналогичных результатов в литературе не описано, что, возможно, связано с отсутствием подобных исследований. Обнаруженный эффект косвенно указывает на то, что в ДНКазной активности IgG-АТ также может иметь место нуклеофильная атака гидроксил-ионом, только активируемым ионами Co^{2+} .

В литературе накапливаются данные о повышенном содержании в различных органах и тканях у больных СКВ АФК, которые так же как и АТ к нДНК могут принимать участие в развитии патологического процесса (Ames et al., 1999; Waszczykowska et al., 1999; Suwannaroj et al., 2001). Поэтому мы провели оценку влияния АФК на активность АТ к нДНК и ДНКаз сывороток крови больных СКВ.

При исследовании влияния АФК (гидроксил-радикала, что было установлено экспериментально) на ДНКазную активность сывороток крови больных СКВ без температурной преинкубации, было установлено, что АФК активируют расщепление суперскрученной ДНК сывороточными ДНКазами (рис. 3). Однако, в зависимости от пациента, АФК или ингибировали, так как содержание суперскрученной ДНК было больше по сравнению с вариантом гидролиза ДНК антителами без АФК (рис. 3А), или не влияли на активность АТ (рис. 3Б), так как отличий от результатов ДНКазной активности АТ без добавления АФК не наблюдалось.

Из литературы известно, что в сыворотке крови больных СКВ снижена активность ДНКаза I, поэтому можно предположить, что АФК-зависимое повышение активности ДНКаза может выступать как компенсаторный механизм низкой активности сывороточных ДНказ. ДНказы в организме выполняют ряд функций, в том числе инициации апоптоза, поэтому наблюдаемый эффект влияния АФК может способствовать появлению большого количества апоптотических клеток. Так, показано, что у больных СКВ скорость апоптоза лимфоцитов, нейтрофилов, эндотелиальных клеток выше, чем у здоровых людей, и коррелирует с активностью заболевания и уровнем АТ к нДНК (Courtney et al., 1999; Stefanec, 2004). Локализованные на мембране апоптотических клеток нуклеосомы могут выступать в качестве аутоантигена, приводящего к гиперпродукции АТ к ДНК, которые могут обладать нуклеазной активностью.

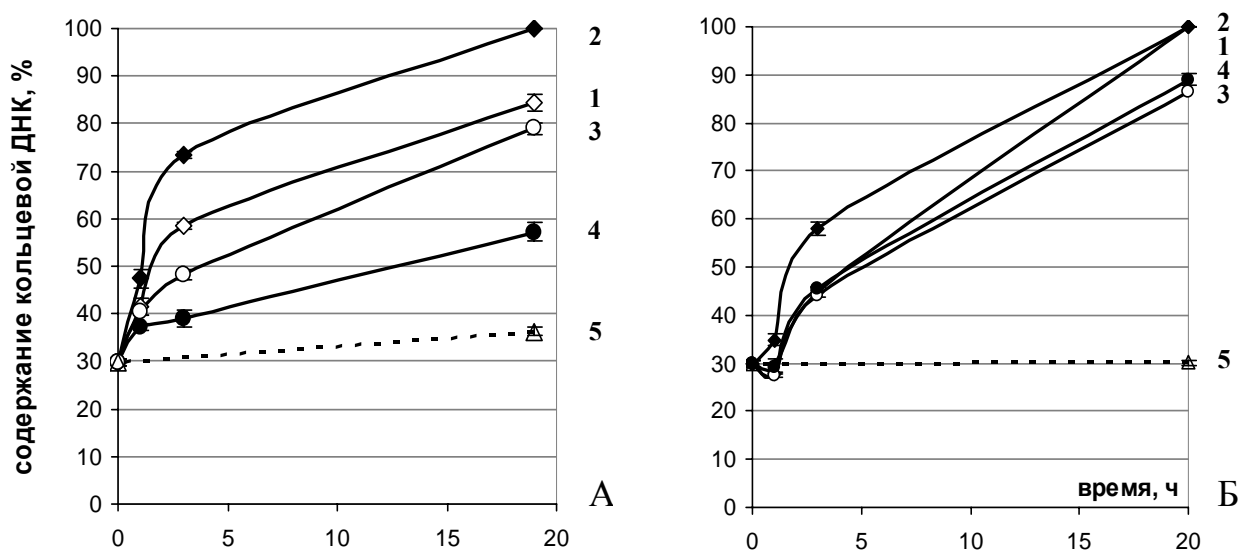


Рис. 3. Влияние АФК на ДНКазную активность двух сывороток СКВ

1 – ДНК pBR-322, инкубированная с сывороткой СКВ, 2 – ДНК, инкубированная с сывороткой СКВ и АФК, 3 – ДНК, инкубированная с сывороткой СКВ, прогретой при +57 °C 45 мин, 4 – ДНК, инкубированная с сывороткой СКВ, прогретой при +57 °C и АФК, 5 – ДНК, инкубированная с АФК

Особое внимание обращает на себя обнаруженный нами факт, что АФК ингибировали как связывание с нДНК в реакции ИФА, так и её гидролиз антителами к нДНК из фракции I (АТ с основными свойствами). Обнаружено, что при увеличении времени инкубации суперскрученной ДНК pBR-322 с АТ субфракции Ia более 6 ч наблюдается уменьшение гидролиза суперскрученной формы ДНК приблизительно на 5%, по сравнению с вариантом, где АФК не были добавлены. При инкубации ДНК с АТ субфракции Ib уже через 3 часа заметно уменьшение активности АТ к нДНК и к окончанию инкубации (15 ч) разница в количестве кольцевой ДНК между вариантами с добавлением АФК и без составила приблизительно 10.5%. Однако в отличие от АТ из фракции I, АФК не влияли на катализ и взаимодействие АТ с нДНК из фракции II (АТ с кислыми свойствами) и, в некоторых случаях, в реакции ИФА даже отмечалось незначительное увеличение взаимодействия АТ с нДНК. Однако остаётся неясным механизм влияния АФК на взаимодействие и гидролиз ДНК антителами, так как подобных исследований в мире не проводилось. Выявленные нами эффекты, возможно, обусловлены тем, что АФК являются регуляторами активности антител, модифицируя белковую молекулу, или непосредственно вмешиваются во взаимодействие АТ с ДНК, но не влияют только на молекулу ДНК. Такое предположение подкрепляется тем, что уровень ответа АТ к нДНК обеих фракций при взаимодействии с АФК-модифицированной ДНК в реакции ИФА выше, чем с нДНК. Различный эффект влияния АФК на активность АТ, вероятно, обусловлен тем, что мы исследовали отдельные субфракции АТ к нДНК.

Для более полной характеристики ДНК-гидролизующей активности АТ к нДНК исследовали кинетические параметры гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 антителами четырёх субфракций. У всех исследованных препаратов АТ величины K_M изменялись в основном от 10^{-8} до 10^{-7} М, что на несколько порядков меньше величины K_M для известных ДНКаз человека (Шапот, 1968), близко к значению для некоторых рестриктаз (например, *EcoRI*, *RsrI* и др.) (ed. Burrell, 1993) и к значению K_M для

ДНК-абзимов, полученных другими авторами. Таким образом, сродство IgG-АТ с ДНКазной активностью к ДНК очень высоко и характерно для взаимодействий «антиген-антитело». Тем не менее, АТ из фракции I характеризуется большим значением K_M , чем АТ из фракции II, и K_M АТ подфракции Ia выше, чем подфракции Ib. Следует обратить внимание на то, что, несмотря на близкие значения K_M , эти субпопуляции АТ отличаются по способности их вытеснения с аффинной матрицы различными элюентами. Вероятно, эти субпопуляции АТ к нДНК различаются силой электростатического и гидрофобного взаимодействий с нДНК-целлюлозой. Однако скорости гидролиза ($V_{\max} \sim 0.02-0.48$ нМ/мин), константы скорости ($k_{\text{cat}} \sim 10^{-3}$ мин⁻¹) и эффективности гидролиза ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 10^{-6}-10^{-5}$ нМ⁻¹мин) были на несколько порядков меньше, чем ДНКазы, *EcoRI* и даже некоторых описанных абзимов к ДНК, но в то же время сопоставимыми с таковыми для некоторых из описанных ранее абзимов (Канышкова и др., 1997; Andrievskaya et al., 2002). Необходимо отметить определённую условность приведённых значений k_{cat} и k_{cat}/K_M , поскольку в их определении использовали максимальное рассчитанное содержание ДНК-абзимов в полученных поликлональных препаратах АТ к нДНК, которое составило приблизительно 1.74-24.88%, так как в настоящее время не известен метод разделения ДНК-гидролизующих и ДНК-связывающих АТ без каталитической активности. Вероятно, содержание каталитически активных IgG в полученных поликлональных препаратах АТ к нДНК может быть значительно меньше. Таким образом, реальная эффективность гидролиза ДНК антителами может быть выше.

Таким образом, анализ литературных данных и полученных нами результатов свидетельствует о том, что реакцию гидролиза катализируют АТ и в реакции расщепления ДНК АТ разных субфракций больных СКВ существенно отличаются от ДНКаз человека.

При сравнении кинетики гидролиза суперскрученной ДНК антителами к нДНК разных субфракций выявлены некоторые сходства и различия между ними. Субфракции АТ к нДНК характеризуются продолжительным временем реакции гидролиза ДНК – 12-15 ч (рис. 4, *внесение одной порции АТ одновременно*). При дальнейшей инкубации достоверных количественных конформационных изменений ДНК не происходит. Исследуемые субфракции IgG-АТ к ДНК не гидролизуют всю суперскрученную ДНК даже при длительной инкубации АТ с ДНК в течение 22 часов и более. Вероятно, АТ к ДНК являются эндонуклеазами и проводят одонитевые разрывы в суперскрученных молекулах ДНК, переводя их в открытые кольцевые молекулы, которые устойчивы к дальнейшему действию АТ, так как накопления линейных форм ДНК не происходит. Из литературы известно, что АТ, как и ферменты, являются конформационно активными и их взаимодействие с ДНК протекает по механизму индуцированного соответствия (Miyazaki et al., 1997; Jang and Stollar, 2003). Возможными конформационными изменениями можно объяснить продолжительный период гидролиза суперскрученной молекулы ДНК плазмиды pBR-322 антителами к ДНК при СКВ.

Антитела субфракций Ia и Pa, полученные элюцией с нДНК-целлюлозы буфером с 1 М NaCl, гидролизуют суперскрученную ДНК более активно, чем АТ субфракций Ib и Pb, которые были элюированы с аффинного сорбента глицин-HCl с pH 2.3, что приводит к накоплению в продуктах реакции кольцевой формы ДНК на 13-15% больше. При инкубации плазмидной ДНК с АТ субфракций Ia и Ib (рис. 4А, Б), внесёнными в два

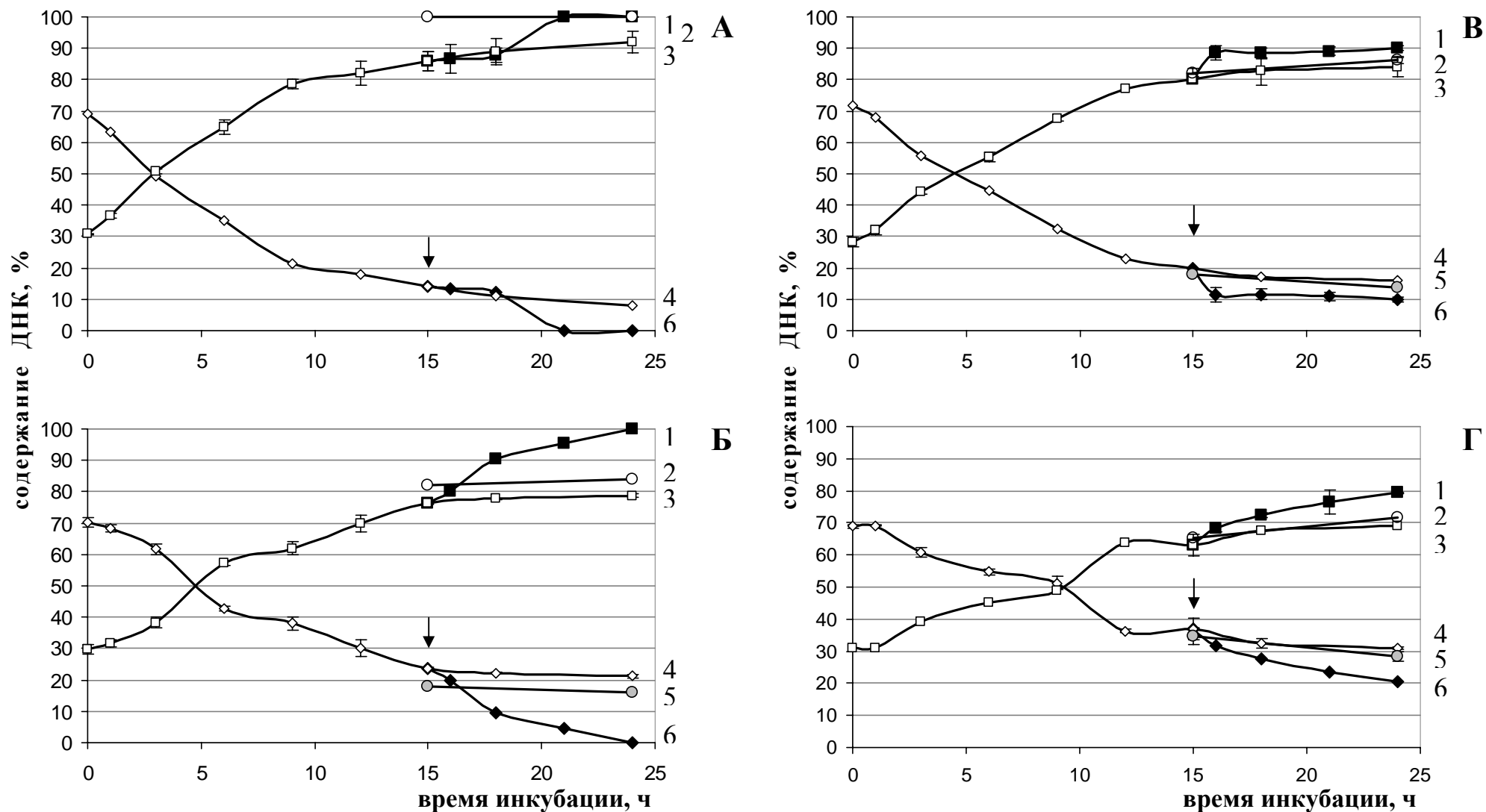


Рис. 4. Кинетические кривые гидролиза плазмидной ДНК рВR-322 антителами к ДНК субфракций Ia (А), Ib (Б), Ia (В) и Ib (Г):

внесение одной порции АТ одновременно – (4, □) суперскрученная ДНК, (3, ◇) кольцевая ДНК; поэтапное внесение двух порций АТ (стрелкой указано время повторного введения антител в инкубационную среду) – (6, ◆) суперскрученная ДНК, (1, ■) кольцевая ДНК; внесение двух порций АТ одновременно – (5, ●) суперскрученная ДНК, (2, ○) кольцевая ДНК

раза большей концентрации (*внесение двух порций АТ одновременно*), приводит к увеличению гидролиза молекул суперскрученной ДНК с переходом в кольцевую форму. Однако для АТ к нДНК субфракций Ia и Ib подобного эффекта не обнаружено (рис. 4В, Г).

Учитывая, что в проведённых исследованиях АТ к ДНК не гидролизуют всю суперскрученную ДНК, провели повторное добавление в реакционную среду равной порции IgG-АТ к нДНК через 15 ч инкубации (*поэтапное внесение двух порций АТ*). Как видно из графиков, повторное внесение АТ в инкубационную среду приводит к дополнительному уменьшению количества суперскрученной ДНК и увеличению количества открытой кольцевой формы, и этот эффект сильнее даже при сравнении с результатами гидролиза ДНК антителами, внесёнными в инкубационную среду в начале эксперимента в той же суммарной концентрации (*внесение двух порций АТ одновременно*). Однако, если для субфракций Ia и Ib повторное внесение АТ приводит к полному гидролизу суперскрученной ДНК через 6 и 9 часов инкубации соответственно, то для АТ к нДНК субфракций Ia и Ib наблюдается увеличение гидролиза суперскрученной ДНК только на 4-10.5% через 1 час после добавления второй порции АТ и дальнейшая инкубация не приводит к изменениям в содержании конформаций плазмидной ДНК.

Обнаруженные эффекты необычной кинетики гидролиза ДНК антителами к нДНК при СКВ позволили предположить, что АТ с ДНКазной активностью обладают непротективным характером действия. Для визуального доказательства механизма действия ДНК-гидролизующих АТ к нДНК и оценки их влияния на молекулу ДНК различных видов и конформаций впервые применили новый метод – атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Визуализация взаимодействия и активности антител к нДНК с ДНК методом атомно-силовой микроскопии

При исследовании взаимодействия препаратов ДНК-гидролизующих АТ к нДНК с ДНК эритроцитов цыплят было обнаружено, что с увеличением времени инкубации ДНК с антителами количество низкомолекулярных фрагментов ДНК увеличивается.

Распределения количества длины молекул ДНК проявляли выраженную асимметрию (рис. 5), поэтому, для сравнения и характеристики полученных данных использовали непараметрические методы. Оценку среднего значения длины молекул ДНК проводили с использованием медианы, а для характеристики разброса данных использовали 25-й и 75-й перцентили, а также 5-й и 95-й перцентили. Вычисленные таким образом средние значения длины молекул ДНК двух контрольных препаратов ДНК без АТ, один из которых инкубировали при +37°C, другой - не подвергали такому воздействию, составили 724.5 нм и 706.6 нм соответственно и различий между двумя образцами ДНК нет ($\alpha < 0.01$).

С увеличением времени инкубации ДНК эритроцитов цыплят с АТ к нДНК субфракций Ia и Ib (рис. 6А, Б) значительно увеличивается количество коротких фрагментов ДНК. Для образцов ДНК после инкубации в течение 9 ч и 24 ч с АТ к нДНК субфракций Ia и Ib среднее значение длины молекул достоверно ($P > 0.95$) уменьшается (509.6 нм до 273.3 нм и 566.3 нм до 238.7 нм для субфракций Ia и Ib соответственно).

Инкубация ДНК с АТ к нДНК подфракций Ia и Ib также приводит к накоплению низкомолекулярной ДНК, но более умеренному (рис. 6В, Г). Инкубация ДНК с

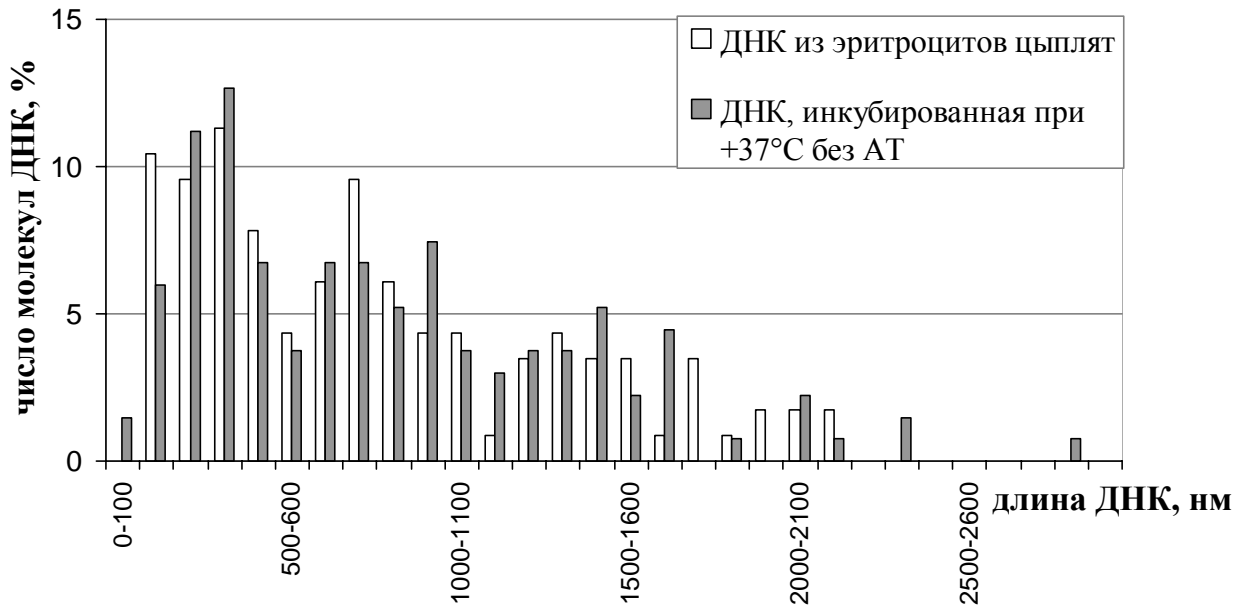


Рис. 5. Распределение по длине (нм) молекул ДНК контрольных образцов без АТ

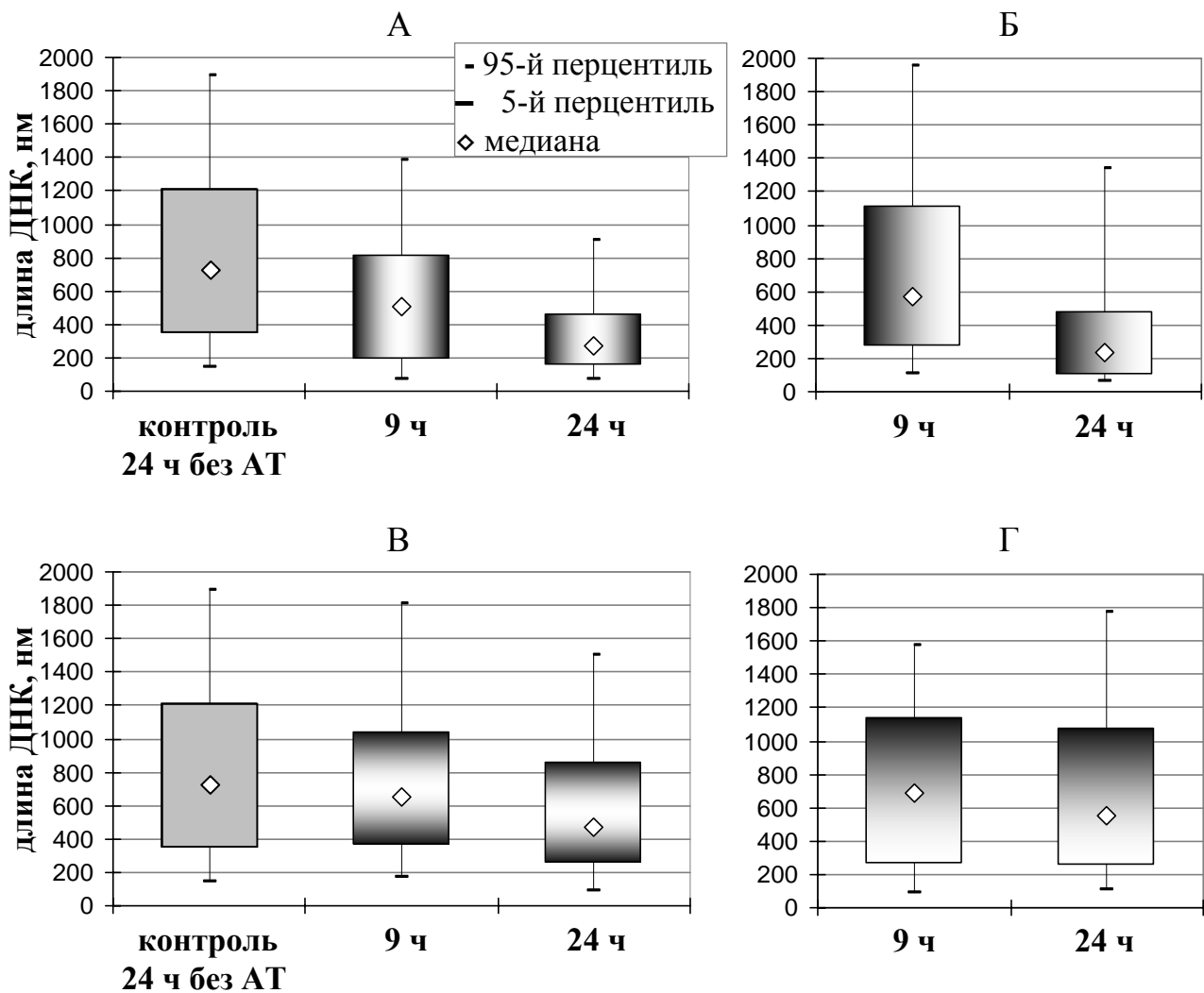


Рис. 6. Зависимость длины молекул ДНК (нм), инкубированной при +37°C с АТ к нДНК субфракции Ia (А), Ib (Б), IIa (В) и IIб (Г), от времени инкубации

АТ субфракции IIa приводит к достоверному снижению ($P > 0.95$) среднего значения длины молекул ДНК, которые составили 649.8 нм и 469.7 нм на 9 ч и 24 ч инкубации соответственно. Однако для АТ подфракции IIb достоверное понижение среднего значения длины молекул ДНК в течение инкубации (685.7 нм до 548.8 нм) было отмечено только при попарном сравнении выборок Т-критерием Манна-Уитни, тогда как другими критериями различий между ними обнаружено не было.

Типичные АСМ-изображения контрольных препаратов ДНК эритроцитов цыплят, плазмидной ДНК pBR-322 и выделенных АТ к нДНК представлены на рис. 7А-В. Экспериментально определённая ширина на полувысоте АСМ-изображений ДНК варьирует в зависимости от зонда от 8.3 до 19.8 нм и имеет среднее значение приблизительно 12.6 нм, а высота 0.22-0.97 нм со средним значением 0.5 нм. Молекулы IgG-АТ имеют шарообразную или овальную форму (которая, вероятно, зависит от посадки Y-образной молекулы на подложку) с диаметрами от 11.2 до 33 нм, и высотой от 0.4 до 1.4 нм со средним значением 0.8 нм. Однако, известно, что диаметр одиночной молекулы ДНК около 2 нм. Завышение латеральных размеров (ширины) полученных изображений макромолекул происходит из-за наложения формы зонда на изображение, а занижение вертикальных (высоты) — из-за деформации молекулы под действием зонда. Следует подчеркнуть, что эти артефакты являются типичными при АСМ-исследованиях макромолекул. Кроме того, значения высоты ДНК, сканируемой на воздухе из-за дегидратации, как правило, ниже, чем ДНК, сканируемой в жидкости (Moreno-Herrero et al., 2003).

После инкубации IgG-АТ с ДНК эритроцитов цыплят было обнаружено, что антитела к нДНК локализовались на молекулах ДНК (рис. 7Г-Ж). В большинстве случаев после 9 ч инкубации АТ к нДНК располагались в середине длинных молекул ДНК. Антитела также были визуализированы на концах коротких и средних по длине молекул, но такие молекулы ДНК встречались гораздо реже. После 24 ч инкубации при +37°C количество коротких молекул ДНК с антителами, локализованными на одном или обоих свободных концах ДНК было значительно больше. Антитела, связавшиеся с ДНК, были также визуализированы в центре и на концах средних по размеру и длинных молекулах ДНК. Место локализации АТ на ДНК характеризуется большими, чем свободные молекулы ДНК и АТ, значениями: диаметром 13.5-36.8 нм и высотой 0.27-1.93 нм.

При изучении влияния ДНК-гидролизующих АТ на конформацию ДНК плазмиды pBR-322 (рис. 7З-К) было обнаружено, что через 9 ч инкубации увеличилось количество молекул кольцевой ДНК, связанных с одной или несколькими молекулами IgG-АТ. Следует отметить, что было обнаружено несколько (около 5) молекул линейной ДНК с АТ на одном конце. После 24 ч инкубации встречаемость суперскрученной ДНК значительно уменьшилась, сильно возросло количество кольцевой ДНК с локализованными несколькими АТ, а также незначительно увеличилась встречаемость линейной ДНК, связанной с АТ к нДНК.

Образование коротких фрагментов ДНК эритроцитов цыплят после инкубации с АТ может быть связано с тем, что, возможно, исходный препарат ДНК содержал одноцепочечные разрывы. С другой стороны, известно, что суперскрученные молекулы плазмидной ДНК содержат денатурированный участок, который исчезает при переходе в кольцевую форму.

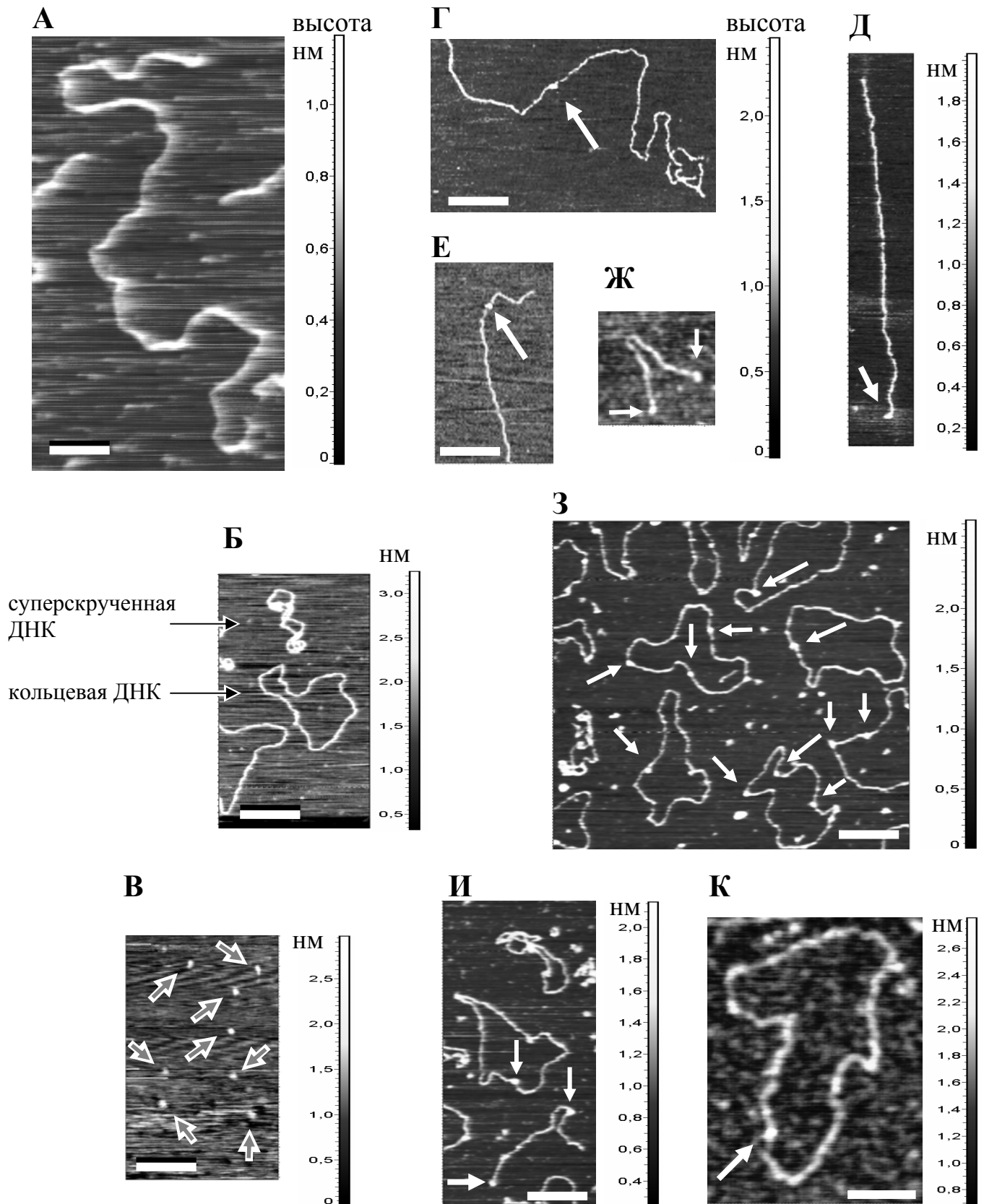


Рис. 7. Исследование взаимодействия АТ к нДНК с ДНК

Контроль: А - ДНК эритроцитов цыпят, Б - плазмидная ДНК pBR-322 после инкубации при +37°C без АТ, В - АТ к нДНК – серо-белая стрелка

Опыт: Г – Ж – ДНК эритроцитов цыпят после инкубации с АТ к нДНК,
 З – К – плазмидная ДНК pBR-322 после инкубации с АТ к нДНК
 Белая стрелка – место локализации АТ на ДНК
 А – И – длина отрезка 200 нм, К – длина отрезка 100 нм

Таким образом, в результате проведённых исследований было обнаружено, что IgG-АТ к нДНК с ДНК-гидролизующей активностью являются эндонуклеазами и имеют предпочтение к гидролизу денатурированной ДНК, тогда как связывание АТ с ДНК происходит в двунитевых участках и место посадки АТ на нДНК, вероятно, может зависеть от нуклеотидной последовательности. Кроме того, возможно, что полученные препараты АТ содержат абзимы, осуществляющие расщепление обеих цепей ДНК, что приводит к появлению в продуктах реакции небольшого количества линейной формы плазмидной ДНК, которую методом электрофореза зарегистрировать не удалось.

Наибольшую активность проявляли препараты абзимов к ДНК из фракции I. Эти АТ субфракции Ia и Ib имеют высокое значение изоэлектрической точки (pI 7.16–8.3) и, вероятно, за счёт электростатических сил могут взаимодействовать с ДНК. Вопрос о заряде патологических АТ к нДНК остаётся спорным, тем не менее, в литературе сложилось общее мнение о том, что патологические IgG к нДНК являются положительно заряженными антителами.

Методом АСМ зарегистрировано образование стабильного иммунного комплекса АТ-ДНК. Вероятно, при взаимодействии абзимов к ДНК с ДНК сначала происходит взаимодействие по механизмам, характерным для образования иммунных комплексов антиген-АТ, а в дальнейшем проявляются ферментативные свойства АТ. Однако, в отличие от обычных ДНКаз, после акта гидролиза фосфодиэфирной связи не происходит освобождения АТ от молекулы ДНК. Таким образом, установлен механизм действия абзимов к ДНК на нДНК и доказан непротессивный характер действия АТ.

Данные литературы свидетельствуют о том, что в большинстве случаев каталитически активные центры различных абзимов расположены в вариабельной части лёгких цепей Ig (Барановский и др., 1998; Andrievskaya et al., 2002; Дубровская и др., 2003). У многих АТ, связывающихся с ДНК, способность взаимодействовать с ДНК присуща тяжёлой цепи (Vargas et al., 1997; Radic and Seal, 1997). Возможно, что в активном антигенсвязывающем центре абзимы имеют два центра: первый – «якорная площадка», которая обуславливает специфичность взаимодействия АТ с молекулой нДНК, и второй – активный центр, ответственный за проявление энзиматической активности.

Большинство авторов придерживаются мнения о том, что патологические IgG-АТ к нДНК обладают широкой перекрёстной реактивностью. Однако в некоторых исследованиях было отмечено, что не всегда перекрёстно реагирующий антиген ингибирует связывание АТ с ДНК (Sharma et al., 2001; Caponi et al., 2002). Эти данные дают возможность предположить, что перекрёстное взаимодействие АТ с разными антигенами может происходить в различных участках антигенсвязывающего центра. Именно наличием двух центров взаимодействия АТ с ДНК, находящихся в различных участках молекулы IgG можно объяснить наблюдаемый нами непротессивный характер действия АТ к ДНК, когда после акта гидролиза фосфодиэфирной связи молекула АТ остаётся связанной с нДНК.

Гетерогенность АТ может быть связана с происхождением ДНК-абзимов: препараты могут содержать как абзимы антиидиотипической природы к активным центрам ферментам (нуклеаз, топоизомераз), так и ДНК-гидролизующие АТ к нуклеиновым кислотам и их комплексам. Принимая во внимание полученные нами результаты и литературные данные можно высказать предположение о том, что разные

субпопуляции АТ к нДНК с ДНК-гидролизующей активностью могут иметь разное происхождение и выполнять разные функции, которые могут зависеть от окружающих условий. Так как при СКВ снижена активность сывороточных ДНКаз, то вероятно некоторые из них могут выполнять компенсаторную функцию, взяв на себя роль нуклеаз. АТ могут выполнять метаболическую и защитную функцию в организме при СКВ. Абзимы к ДНК могут участвовать в утилизации нуклеосомной ДНК апоптотных клеток после их поглощения макрофагами. Учитывая тот факт, что АТ могут проникать в клетку и ядро, абзимы могут участвовать в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Не исключено, что в отличие от обычных ферментов, природные IgG-абзимы могут быть антителами с уникальным гидролитическим центром.

ВЫВОДЫ

1. Из сыворотки крови больных СКВ выделены четыре субфракции IgG-антител к нативной ДНК, проявляющих различное сродство к аффинному сорбенту нДНК-целлюлозе, обладающих термостабильной ДНК-гидролизующей активностью, и различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе.
2. ДНК-гидролизующие антитела к нативной ДНК являются металлозависимыми эндонуклеазами, вносят в ДНК преимущественно одноцепочечные разрывы и проявляют активность в широком диапазоне значений pH. Определены константы ферментативной реакции антителами к нативной ДНК (K_M 10^{-8} - 10^{-7} М), которые на несколько порядков меньше величины K_M для известных ДНКаз человека.
3. Установлено, что при СКВ термолабильная ДНКазная активность сывороточных нуклеаз активируется активными формами кислорода в отличие от термостабильной ДНК-гидролизующей активности антител к нативной ДНК, которая не изменяется или ингибируется под действием активных форм кислорода.
4. Впервые методом атомно-силовой микроскопии получены трехмерные изображения комплексов ДНК–ДНК-гидролизующее антитело к нативной ДНК с нанометровым разрешением и показано, что для ДНКазной активности антител к нативной ДНК характерен непротективный механизм действия, то есть после разрыва фосфодиэфирной связи антитело-фермент остается связанным с ДНК.
5. Установлено, что в активном антигенсвязывающем центре абзимы имеют два участка: первый – «якорная площадка», которая обуславливает специфичность взаимодействия антител с молекулой ДНК, и второй – активный центр, ответственный за проявление энзиматической активности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Темников, Д.А. Фракционирование белков сыворотки крови методом ионообменной хроматографии / Д.А. Темников, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений: сб. тез. докл. / IX международная конф. молодых учёных. – Казань, 1998. – С. 72, 269.
2. Temnikov, D.A. Different fractions of anti-DNA antibodies can affect growth of cultured cells / D.A. Temnikov, **T.A. Nevzorova**, L.V. Nevzorova, Vinter V.G. // abstracts / 5th IUBMB Conference on the Biochemistry of Health and Diseases. - Jerusalem (Israel), 1998. - P. 89.

3. Темников, Д.А. Влияние антител к ДНК на рост клеточной культуры *in vitro* / Д.А. Темников, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Сп. б. Цитология. - 1999. - Т.41. - №3/4. - С. 316-317.
4. Темников, Д.А. Характеристика антител к ДНК как маркеров аутоиммунного процесса / Д.А. Темников, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Социум в преддверии XXI века: итоги пройденного пути, проблемы настоящего и контуры будущего: сб. материалов / Всероссийская междисциплинарная науч. конф. III Вавиловские чтения. - Йошкар-Ола, 1999. - Ч.2. - С.8-11.
5. **Невзорова, Т.А.** Выделение аутоантител к ядерной ДНК из сыворотки крови больных системной красной волчанкой и исследование характера действия этих аутоантител на ДНК / **Т.А. Невзорова**, Д.А. Темников, В.Г. Винтер // Сп. б. Цитология. - 2000. - Т.42. - №3. - С. 299.
6. **Невзорова, Т.А.** Аутоантитела к ДНК при системной красной волчанке (Обзор) / **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер; Казан. ун-т. - Казань, 2000. - 28 с. - Деп. в ВИНТИ 13.10.00, № 2628-B00.
7. **Невзорова, Т.А.** Каталитические антитела. Нуклеазная активность антител / **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер; Казан. ун-т. - Казань, 2000. - 16 с. - Деп. в ВИНТИ 13.10.00; № 2627-B00.
8. **Невзорова, Т.А.** Нуклеазная активность антител при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Ферменты микроорганизмов: сб. докл. / XII юбилейная всероссийская конф. – Казань, 2001. – С.79-80.
9. **Невзорова, Т.А.** Особенности дезоксирибонуклеазной активности антител к ДНК при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, Д.А. Темников, В.Г. Винтер // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: сб. материалов / II Российская конф. молодых учёных России с международным участием. – Москва, 2001. – Т. 1 - С.187-188.
10. Темников, Д.А. Аутоантитела к ДНК теряют способность гидролизовать ДНК под действием преднизолона / Д.А. Темников, В.Г. Винтер, М.М. Куренёва, Д.И. Темникова, **Т.А. Невзорова** // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: сб. материалов / II Российская конф. молодых учёных России с международным участием. – Москва, 2001. – Т. 2 - С. 163-164.
11. **Невзорова, Т.А.** Некоторые особенности абзимов к ДНК при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, Д.А. Темников, В.Г. Винтер; Казан. ун-т. - Казань, 2002. - 19 с. - Деп. в ВИНТИ 05.03.02; № 425-B2002.
12. Темников, Д.А. Антитела к ДНК сохраняют способность гидролизовать ДНК после инкубации при повышенной температуре / Д.А. Темников, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер; Казан. ун-т. - Казань, 2002. - 12 с. - Деп. в ВИНТИ 05.03.02; № 424-B2002.
13. **Невзорова, Т.А.** Гетерогенность аутоантител к ДНК с ДНК-гидролизующей активностью у больных системной красной волчанкой / **Т.А. Невзорова**, Ю.С. Кулапина, В.Г. Винтер // сб. тез. науч. докл. / III съезд биохимического общества. – Санкт-Петербург, 2002. – С.598.
14. Темников, Д.А. Пролиферация культивируемых клеток почки под действием аутоантител к ДНК / Д.А. Темников, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Клеточные культуры. – 2003. - №18. – С. 14-21.
15. **Невзорова, Т.А.** Влияние активных форм кислорода на ДНК-гидролизующую

- активность сывороток крови при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер // Новая Геометрия Природы: сб. науч. тр. / Международная науч. конф. – Казань. – 2003. – Т.2. – С. 257-260.
16. **Невзорова, Т.А.** Выделение и фракционирование аутоантител к ДНК при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, Ю.С. Кулапина, В.Г. Винтер // Новая Геометрия Природы: сб. науч. тр. / Международная науч. конф. – Казань. – 2003. – Т.2. – С. 422-427.
17. **Невзорова, Т.А.** Особенности ДНК-гидролизующей активности антител при системной красной волчанке / **Т.А. Невзорова**, Д.А. Темников, В.Г. Винтер // Биохимия. – 2003. – Т.68. - №12. – С. 1616 – 1623.
18. Коновалова, О.А. Атомно-силовая микроскопия для визуализации ДНК в биохимических исследованиях / О.А. Коновалова, **Т.А. Невзорова**, М.Х. Салахов, В.Г. Винтер // Когерентная оптика и спектроскопия: сб. науч. ст. / VII Всероссийская молодёжная научная школа. – Казань. – 2003. – С. 312-318.
19. **Невзорова, Т.А.** Оптимизация режимов сканирования молекул ДНК методом атомно-силовой микроскопии / **Т.А. Невзорова**, О.А. Коновалова, В.Г. Винтер, М.Х. Салахов // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тез. докл. / XXI Всероссийская конф. – Яльчик, 2004. - С. 187.
20. Коновалова, О.А. Сканирование молекул ДНК полуконтактным методом атомно-силовой микроскопии / О.А. Коновалова, **Т.А. Невзорова**, В.Г. Винтер, М.Х. Салахов // Когерентная оптика и спектроскопия: сб. науч. тр. / VIII Международная молодёжная науч. школа. – Казань. – 2004. – С. 89-94.